

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-345485

(43)Date of publication of application : 03.12.2002

(51)Int.Cl.

C12N 15/09**A01H 1/04****C12Q 1/68**

(21)Application number : 2001-247600

(71)Applicant : JAPAN TOBACCO INC
SYNGENTA LTD

(22)Date of filing : 17.08.2001

(72)Inventor : KOMORI TOSHIYUKI
YAMAMOTO TOSHINAKA
NITTA NAOTO
TAKEMORI NAOKI

(30)Priority

Priority number : 2000247204 Priority date : 17.08.2000 Priority country : JP

**(54) METHOD FOR ESTIMATING GENOTYPE OF FERTILITY RESTORATIVE GENE LOCUS
FOR ORYZA SATIVA BT-TYPE MALE STERILE CYTOPLASM****(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for detecting the fertility restorative gene (Rf-1 gene) of Oryza sativa individuals for RT-type male sterile cytoplasm having been utilized for raising hybrid rice.

SOLUTION: This method comprises detecting the Rf-1 gene by making use of the fact that a plurality of PCR marker loci present in the proximity of the Rf-1 gene locus link with the Rf-1 gene locus. More specifically, this method comprises easily and accurately investigating the presence/absence of the Rf-1 gene and screening Rf-1 gene homo-type individual(s) by assaying the genotype of the plurality of PCR marker loci present in the proximity of the Rf-1 gene locus by making use of the fact that the Rf-1 gene locus lies between the new PCR marker loci, i.e. S12564 Tsp509I locus and C1361 MwoI locus, present on the Oryza sativa 10th chromosome.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

METHOD FOR ESTIMATING GENOTYPE OF FERTILITY RESTORATIVE GENE LOCUS FOR ORYZA SATIVA BT-TYPE MALE STERILE CYTOPLASM

Publication number: JP2002345485
Publication date: 2002-12-03
Inventor: KOMORI TOSHIYUKI; YAMAMOTO TOSHINAKA; NITTA NAOTO; TAKEMORI NAOKI
Applicant: JAPAN TOBACCO INC; SYNGENTA LTD
Classification:
- **international:** A01H1/04; C12N15/09; C12Q1/68; A01H1/04; C12N15/09; C12Q1/68; (IPC1-7): C12N15/09; A01H1/04; C12Q1/68
- **European:**
Application number: JP20010247600 20010817
Priority number(s): JP20010247600 20010817; JP20000247204 20000817

[Report a data error here](#)**Abstract of JP2002345485**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for detecting the fertility restorative gene (Rf-1 gene) of *Oryza sativa* individuals for RT-type male sterile cytoplasm having been utilized for raising hybrid rice. **SOLUTION:** This method comprises detecting the Rf-1 gene by making use of the fact that a plurality of PCR marker loci present in the proximity of the Rf-1 gene locus link with the Rf-1 gene locus. More specifically, this method comprises easily and accurately investigating the presence/absence of the Rf-1 gene and screening Rf-1 gene homo-type individual(s) by assaying the genotype of the plurality of PCR marker loci present in the proximity of the Rf-1 gene locus by making use of the fact that the Rf-1 gene locus lies between the new PCR marker loci, i.e. S12564 Tsp509I locus and C1361 MwoI locus, present on the *Oryza sativa* 10th chromosome.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-345485

(P2002-345485A)

(43)公開日 平成14年12月3日 (2002.12.3)

(51)Int.Cl.⁷
C 1 2 N 15/09
A 0 1 H 1/04
C 1 2 Q 1/68

識別記号
Z N A

F I
A 0 1 H 1/04
C 1 2 Q 1/68
C 1 2 N 15/00

テ-マコ-ト(参考)
2 B 0 3 0
A 4 B 0 2 4
Z N A A 4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 20 頁)

(21)出願番号 特願2001-247600(P2001-247600)
(22)出願日 平成13年8月17日 (2001.8.17)
(31)優先権主張番号 特願2000-247204(P2000-247204)
(32)優先日 平成12年8月17日 (2000.8.17)
(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 000004569
日本たばこ産業株式会社
東京都港区虎ノ門二丁目2番1号
(71)出願人 593005116
シンジェンタ リミテッド
イギリス国 サリー ジーユー2 7ワイ
エッチ、ギルドフォード、サリー リサー
チ パーク、ブリーストリー ロード
(72)発明者 小森 俊之
静岡県磐田郡豊田町東原700番地 株式会
社オリノバ内
(74)代理人 100089705
弁理士 社本 一夫 (外5名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 イネBT型雄性不稔細胞質に対する稔性回復遺伝子座の遺伝子型を推定する方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】ハイブリッドライス育成に利用されているBT型雄性不稔細胞質に対するイネ個体の稔性回復遺伝子 (Rf-1遺伝子) を検出する方法を提供する。

【解決手段】Rf-1遺伝子座の近傍に存在する複数のPCRマーカー座が、Rf-1遺伝子座と連鎖することを利用して、Rf-1遺伝子を検出する方法に関する。さらに具体的には、本発明は、Rf-1遺伝子座がイネ第10染色体上に存在する新規のPCRマーカー座S12564 Tsp509I座とC1361 MwoI座との間に座乗することを利用して、近傍に存在する複数のPCRマーカー座の遺伝子型を検定することにより、Rf-1遺伝子の有無の調査およびRf-1遺伝子ホモ型個体の選抜を、簡便かつ正確に実施する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 稔性回復遺伝子（Rf-1遺伝子）座がイネ第10染色体上のRFLPマークー座S12564座とC1361座との間に座乗することを利用して、被検定イネ個体または種子がRf-1遺伝子を持つか否かを識別する方法。

【請求項2】 次のPCRマークー：

- (1) SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素EcoRI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマークーR1877 EcoRI；
- (2) SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:4の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素HindIII認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマークーG4003 HindIII；
- (3) SEQ ID NO:5およびSEQ ID NO:6の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素MwoI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマークーC1361 MwoI；
- (4) SEQ ID NO:7およびSEQ ID NO:8の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素MwoI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマークーG2155 MwoI；
- (5) SEQ ID NO:9およびSEQ ID NO:10の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素MspI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマークーG291 MspI；
- (6) SEQ ID NO:11およびSEQ ID NO:12の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素Bs1I認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマークーR2303 Bs1I；
- (7) SEQ ID NO:13およびSEQ ID NO:14の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素BstUI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマークーS10019 BstUI；
- (8) SEQ ID NO:15およびSEQ ID NO:16の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素KpnI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマークーS10602 KpnI；および
- (9) SEQ ID NO:17およびSEQ ID NO:18の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素Tsp509I認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネ

の間の多型を検出する、PCRマークーS12564 Tsp509I；からなる群から選択されるPCRマークーの少なくとも1個を検出することを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 (a) PCRマークーR1877 EcoRI、G291 MspI、R2303 Bs1IおよびS12564 Tsp509Iからなる群から選択される少なくとも1個のPCRマークー、および、(b) PCRマークーC1361 MwoI、S10019 BstUI、G4003 HindIII、S10602 KpnIおよびG2155 MwoIからなる群から選択される少なくとも1個のPCRマークーの両者が増幅産物中に存在する場合に、被検定イネ植物個体または種子がRf-1遺伝子を有すると判断する、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 PCRマークーS12564 Tsp509IおよびC1361 MwoIの存在を調べることを特徴とする、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 請求項3に記載した(a)及び(b)のうちの少なくとも一方の群のPCRマークーの2個以上を用いて、被検定個体のRf-1遺伝子座周辺遺伝子座の遺伝子型を検定することにより、Rf-1遺伝子ドナー親由来の導入染色体領域を調べる方法。

20 【請求項6】 SEQ ID NO:1～18のいずれか1つの配列を有する、請求項2の方法に使用するプライマー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ジャポニカ米-ジャポニカ米ハイブリッドライス育成に利用されているBT型雄性不稔細胞質に対するイネ個体の稔性回復遺伝子（Rf-1遺伝子）を検出する方法に関する。

30 【0002】より具体的には、本発明は、Rf-1遺伝子座がイネ第10染色体上に存在するDNAマークー座S12564 Tsp509I座とC1361 MwoI座との間に座乗することを利用して、近傍に存在するPCRマークーを検出することにより、Rf-1遺伝子の有無の調査およびRf-1遺伝子ホモ型個体の選抜を、簡便かつ正確に実施する方法に関する。

【0003】

【従来の技術】イネは自殖性植物であるため、品種間で交雑を行う場合には、まず自家受精を避けるためにイネの穎花が開花する直前に穎花内の雄しべを全て取り除き、次いで交雫をする花粉親品種由来の花粉を用いて受精させる必要がある。しかしながら、このような手作業による交雫方法で商業的規模での大量の雑種種子の生産をすることは不可能である。

40 【0004】そこで、ハイブリッドライスの生産には、細胞質雄性不稔を利用する三系法が利用されている。三系法とは、雄性不稔細胞質を保有する系統である不稔系統、Rf-1遺伝子を保有する系統である回復系統、および核遺伝子は不稔系統と同一であって不稔細胞質を保有しない系統である維持系統とを使用する方法をいう。これらの3品種を用いて、(i)不稔系統に回復系統の花粉を受精させることによりハイブリッド種子を獲得することができ、(ii)一方、不稔系統に維持系統の花粉を受精させ

ることにより不稔系統を維持することができる。

【0005】三系法でBT型雄性不稔細胞質を利用するにあたっては、回復系統のイネを育成するために、育種における各過程で育成中のイネがRf-1遺伝子を保有すること、また、最終段階ではRf-1遺伝子をホモで保有することを確認する必要がある。また、三系法において、回復系統に使用する品種が確実にRf-1遺伝子を保有することを調べたり、得られたハイブリッド種子が稔性を回復しているか確認するために、Rf-1遺伝子の存在を調べる必要が生じる場合もある。

【0006】従来、植物体中でのRf-1遺伝子座の遺伝子型を推定するためには、まず、検定系統と交配を行った交配種子から植物体(F1)を形成し、次いでF1植物を自殖させてその種子の形成率が一定以上(例えは70~80%以上)である個体の出現頻度を調査する必要があった。なお、検定系統とは、維持系統、不稔系統あるいは両系統のセットを指し、目的とする被検定個体の細胞質がBT型か通常細胞質か、あるいは不明かにより適宜選択するものである。不稔系統の場合は母親として、維持系統の場合は父親として、それぞれ被検定個体に交配する。

【0007】しかしながら、これらの方法を行うには、莫大な労力と時間を要する。また、種子稔性は、環境要因の影響を受けやすいので、低温・日照不足などの不良環境で調査すれば、遺伝子型の構成によらず不稔になる場合があり、Rf-1遺伝子座の遺伝子型推定が正確に行えないという問題を有していた。

【0008】このような問題を解消するために、最近では、分子生物学的方法によりRf-1遺伝子の存在を判別する方法も提案されている。それは、Rf-1遺伝子と連鎖する塩基配列(以下、DNAマーカーという)を検出することにより、Rf-1遺伝子の存在または不存在を調べる方法である。因みに、Rf-1遺伝子のDNA配列は未解読であるため、直接Rf-1遺伝子を検出することは、現在の技術では不可能である。

【0009】例えば、イネのRf-1遺伝子座は第10染色体上に存在し、そして、制限酵素断片長多型(RFLP)解析に使用することができるDNAマーカー(RFLPマーカー)座G291とG127との間であることが報告されている(Fukuta et al. 1992, Jpn. J. Breed. 42 (suppl. 1) 164-165)。このように、Rf-1遺伝子と連鎖するDNAマーカー座G291およびG127の遺伝子型を調査することにより、Rf-1遺伝子座の遺伝子型を推定する方法が知られている。

【0010】しかしながら、従来の分子生物学的方法にはいくつかの問題が存在する。第一の問題は、従来の方法では、使用的マーカーがRFLPマーカーであり、これを検出するためにはサザンプロット解析を行う必要があるという点である。サザンプロット解析を行うためには、被検定個体から数マイクログラム単位のDNAの精製を必要とし、さらに制限酵素処理、電気泳動、プロッテ

ィング、プローブとのハイブリダイゼーション、およびシグナルの検出からなる一連の作業手順を行う必要があるため、多大な労力が必要であるうえに、検定結果を得るまでに1週間程度かかっていた。

【0011】第二の問題は、RFLPマーカー座G291とG127の間の遺伝子地図距離は約30 cM(イネDNAでは約9000 kbpに相当する)と長いため、二重組換えが起こる可能性が数%程度はあると考えられ、Rf-1遺伝子座の遺伝子型が必ずしも正確に推定できないことである。

10 【0012】さらに第三の問題は、Rf-1遺伝子の存在をRFLPマーカー座G291およびG127を検出することにより推定する場合、育種の結果選抜される稔性回復系統には、Rf-1遺伝子と共に、RFLPマーカー座G291とG127の間の遺伝子領域も導入されるという点である。その結果、導入DNA配列は30 cM以上のRf-1遺伝子ドナー親由来の染色体領域を有することになり、導入DNA領域中に存在する可能性がある劣悪遺伝子をRf-1遺伝子と同時に導入してしまう危険性があった。

【0013】このような問題を解決するため、Rf-1遺伝子座と連鎖する優性DNAマーカー(特開平7-222588)および共優性DNAマーカー(特開平9-313187)が開発されている。これらのマーカーは、Rf-1遺伝子座とそれぞれ、 1.6 ± 0.7 cM(イネDNAでは約480 kbpに相当)および 3.7 ± 1.1 cM(イネDNAでは約1110 kbpに相当)の遺伝距離で連鎖しており、両座はRf-1遺伝子座を挟む位置関係にある。そのため、優性PCRマーカー座および共優性PCRマーカー座は、これらが両方とも存在することを検出することにより、Rf-1遺伝子の存在を推定することができる。また、共優性PCRマーカーの使用は、Rf-1遺伝子座の遺伝子型がホモかヘテロかも推定することを可能にする。

【0014】しかしながら、これらのPCRマーカーを使用する場合にも、依然としていくつかの問題がある。この共優性マーカーはRf-1遺伝子座と 3.7 ± 1.1 cMの遺伝距離を有するため、Rf-1遺伝子座との間での組換え頻度が高いという問題が十分には解決されていない。その結果、共優性マーカー自体についてはホモ型またはヘテロ型まで正確に検出することができるが、共優性マーカー座とRf-1遺伝子座との間で組換えが生じる場合に、Rf-1遺伝子座の遺伝子型の推定、特にホモ型またはヘテロ型までの推定を正確に実施できないという問題がある。一方、優性マーカーを使用してRf-1遺伝子座の遺伝子型を推定する場合、優性マーカーではRf-1遺伝子がホモの個体(Rf-1/Rf-1)およびヘテロの個体(Rf-1/rf-1)の両方を区別することなく検出してしまう。そのため、上記共優性マーカーと優性マーカーとを組み合わせて利用してRf-1遺伝子座の遺伝子型を推定したとしても、Rf-1遺伝子に関するホモ型とヘテロ型とを正確に識別することはできない。また、優性マーカーを用いて行うPCRでは、PCR産物が得られなかった場合には、実験操作上の

問題に起因する可能性も否定できない。さらに、これらのが共優性マーカーと優性マーカーとの間の遺伝子距離が約5.3 cM (約1590 kbp) と離れているため、Rf-1遺伝子ドナー親からの導入染色体領域長を短い長さに限定することができないので、この領域中に含まれる劣悪遺伝子の持ち込みを抑制できないという問題点も有している。

【0015】さらに、特開2000-139465号には、イネ第10染色体のRf-1遺伝子の近傍に座乗するRFLPマーカーの塩基配列に基づいて開発された、共優性PCRマーカーが記載されている。しかしながら、それらのPCRマーカーの多くは、Rf-1遺伝子からの遺伝子距離が約1cMより離れているという問題がある。

【0016】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、Rf-1遺伝子座と密接に連鎖し、かつ、Rf-1遺伝子座を挟む位置関係にある複数の共優性PCRマーカーを開発することにより、Rf-1遺伝子座の存在及び、それがヘテロまたはホモのいずれで存在するかを簡便かつ正確に推定する方法を提供することである。

【0017】

【課題を解決するための手段】本発明は、ハイブリッドライス育成に利用されているBT型雄性不稔細胞質に対する回復遺伝子であるRf-1遺伝子を検出する方法を提供する。より具体的には、本発明者らはRf-1遺伝子座の存在部位を第10染色体の極めて狭い範囲に特定した。本発明はその結果に基づいて、Rf-1遺伝子座の近傍に存在するPCRマーカーを開発し、これらのPCRマーカーが、Rf-1遺伝子座と連鎖することを利用して、Rf-1遺伝子を検出する方法を提供する。具体的には、本発明は、Rf-1遺伝子座が、イネ第10染色体上に存在するPCRマーカー座S1256 4 Tsp509I座とC1361 MwoI座との間に座乗することを利用して、近傍に存在する新規のPCRマーカーを検出することにより、Rf-1遺伝子の有無の調査およびRf-1遺伝子ホモ型個体の選抜を、簡便かつ正確に実施する。

【0018】マーカー

Rf-1遺伝子座の近傍に存在する特定の領域に対して設計したプライマー対を用いてPCRを行い、その産物を特定の制限酵素で処理後電気泳動にかけると、ジャポニカ系統とインディカ系統との間で、異なる大きさのバンドが観察されることがある。その用な場合、本明細書においては、インディカ系統に特徴的なバンドをRf-1連鎖バンドとする。本発明により、Rf-1遺伝子座は、イネ第10染色体上に存在するPCRマーカー座S12564 Tsp509I座とC1361 MwoI座との間に座乗することが明らかになったので、その周辺でのPCRマーカーは、当業者が適宜開発して使用可能である。

【0019】例えば、本発明は下記の群から選択されるPCRマーカーの少なくとも1個を被検体イネのゲノム中に存在するか否か検出することにより、被検定個体がこれらのPCRマーカーと連鎖するRf-1遺伝子を持つか否かを

識別する：

- (1) マーカー1： SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素EcoRI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーR1877 EcoRI；
- (2) マーカー2： SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:4の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素HindIII認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーG4003 HindIII (SEQ ID NO:19)；
- (3) マーカー3： SEQ ID NO:5およびSEQ ID NO:6の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素MwoI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーC1361 MwoI (SEQ ID NO:20)；
- (4) マーカー4： SEQ ID NO:7およびSEQ ID NO:8の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素MwoI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーG2155 MwoI (SEQ ID NO:21)；
- (5) マーカー5： SEQ ID NO:9およびSEQ ID NO:10の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素MspI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーG291 MspI (SEQ ID NO:22)；
- (6) マーカー6： SEQ ID NO:11およびSEQ ID NO:12の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素Bs1I認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーR2303 Bs1I (SEQ ID NO:23)；
- (7) マーカー7： SEQ ID NO:13およびSEQ ID NO:14の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素BstU1認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーS10019 BstU1 (SEQ ID NO:24)；
- (8) マーカー8： SEQ ID NO:15およびSEQ ID NO:16の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミックPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素KpnI認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカーS10602 KpnI (SEQ ID NO:25)；および
- (9) マーカー9： SEQ ID NO:17およびSEQ ID NO:18の配列を有するDNAをプライマーとして用いてゲノミック

クPCRを行い、得られた産物中の、制限酵素Tsp509I認識部位の有無に基づいて、ジャポニカ系統とインディカ系統のイネの間の多型を検出する、PCRマーカー-S12564 Tsp509I (SEQ ID NO:26)。

【0020】なお、上記PCRマーカーは、Rf-1遺伝子座が、イネ第10染色体上の9個のRFLPマーカー領域R1877、G291、R2303、S12564、C1361、S10019、G4003、S10602、およびG2155付近に座乗する可能性が高いと考え (Fukuta et al. 1992, Jpn J. Breed. 42 (suppl.1) 164-165によるRFLP連鎖解析結果、およびHarushima et al. 1998, Genetics 148 479-494によるイネRFLP連鎖地図を参照)、これらのRFLPマーカーを、後記実施例1に記載するようにして、共優性PCRマーカーであるCAPSマーカーまたはdCAPSマーカー (Michaels and Amasino 1998, The Plant Journal 14(3) 381-385; Neff et al. 1998, The Plant Journal 14(3) 387-392) に変換した。この変換により、上記PCRマーカーが得られた。

【0021】これらのPCRマーカーのうち、PCRマーカーR1877 EcoRI、G291 MspI (SEQ ID NO:22)、R2303 Bs1I (SEQ ID NO:23) およびS12564 Tsp509I (SEQ ID NO:26) からなる群と、PCRマーカー-C1361 MwoI (SEQ ID NO:20)、S10019 BstUI (SEQ ID NO:24)、G4003 HindIII (SEQ ID NO:19)、S10602 KpnI (SEQ ID NO:25)、およびG2155 MwoI (SEQ ID NO:21) からなる群とは、第10染色体上でRf-1遺伝子座を挟んで反対側に存在する。したがって、本発明の好ましい態様としては、(a)PCRマーカー-R1877 EcoRI、G291 MspI、R2303 Bs1I およびS12564 Tsp509I からなる群から選択される少なくとも1個のPCRマーカー、および(b) PCRマーカー-C1361 MwoI、S10019 BstUI、G4003 HindIII、S10602 KpnI、およびG2155 MwoI からなる群から選択される、各々少なくとも1個のPCRマーカーによりRf-1連鎖バンドを検出することにより、Rf-1遺伝子の存在を検出する。その際、上記(a)の群からRf-1遺伝子に最も近いマーカーとして、少なくともPCRマーカー-S12564 Tsp509I および上記(b)の群から少なくともC1361 MwoIを使用することが好ましい。被検定イネのゲノム中に、(a)のPCRマーカーによるRf-1連鎖バンドと(b)のPCRマーカーによるRf-1連鎖バンドの両方が検出されれば、そのイネがRf-1遺伝子を有する可能性を極めて高い確率で推定することができる。

【0022】本発明の別の態様においては、上記(a)の群から少なくとも二つのPCRマーカー、及び(b)の群から少なくとも二つのPCRマーカーによりRf-1連鎖バンドを検出する。例えば、(a)及び(b)の群のマーカーのうち、図1に示す遺伝子地図において、Rf-1遺伝子により近いマーカーによりRf-1連鎖バンドが検出され、それよりRf-1遺伝子から遠いマーカーによりRf-1連鎖バンドが検出されないイネ個体を選抜することにより、Rf-1遺伝子を有するが、不要な遺伝子領域をできるだけ含まないイネを選抜することが可能である。この場合も、(a) 及

び(b) の各群のマーカーのうち少なくとも一つは、それぞれPCRマーカー-S12564 Tsp509IおよびC1361 MwoIであることが好ましい。すなわち、2種のPCRマーカー座S12564 Tsp509IとC1361 MwoIは、マーカー座間距離にして0.3 cMしか離れていない。この性質を利用することにより、Rf-1遺伝子ドナー親から導入する染色体領域を1 cM程度に狭めることができる。その結果、ドナー親のRf-1遺伝子近傍に存在する可能性がある劣悪遺伝子が回復系統に導入される可能性を最小限に抑えることができる。

【0023】プライマー

本発明は別の観点において、上記PCRマーカーを増幅するための下記プライマー対も提供する。これらのプライマー対も、実施例1の記載のようにして得られたものである。

(1) プライマー対 1: PCRマーカー-R1877 EcoRIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:1およびSEQ ID NO:2の塩基配列を有する。

(2) プライマー対 2: G4003 HindIIIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:4の塩基配列を有する。

(3) プライマー対 3: C1361 MwoIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:5およびSEQ ID NO:6の塩基配列を有する。

(4) プライマー対 4: G2155 MwoIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:7およびSEQ ID NO:8の塩基配列を有する。

(5) プライマー対 5: G291 MspIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:9およびSEQ ID NO:10の塩基配列を有する。

(6) プライマー対 6: R2303 Bs1Iを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:11およびSEQ ID NO:12の塩基配列を有する。

(7) プライマー対 7: S10019 BstUIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:13およびSEQ ID NO:14の塩基配列を有する。

(8) プライマー対 8: S10602 KpnIを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:15およびSEQ ID NO:16の塩基配列を有する。

(9) プライマー対 9: S12564 Tsp509Iを増幅するためのプライマー対は、SEQ ID NO:17およびSEQ ID NO:18の塩基配列を有する。

【0024】これらのプライマー対をそれぞれ用いることにより、それぞれ対応するPCRマーカーをイネゲノムから増幅して検出することができる。さらに、これらの特定の塩基配列を含む若干長い塩基配列、あるいはこれら特定の塩基配列より若干短い塩基配列もプライマーとして使用することは、本発明の範囲に含まれる。

【0025】Rf-1遺伝子の検出

本発明の方法により、被検定イネゲノム中のRf-1遺伝子を検出するには、上記本発明のプライマーを用いて、被

検定イネゲノムから上記PCRマーカーのいずれかをPCRで増幅させ、ポリメラーゼ連鎖反応-制限酵素断片長多型(PCR-RFLP)法で検出する。

【0026】PCR-RFLP法は、比較する品種系統間において、PCRにより増幅したDNA断片配列中の制限酵素認識部位に多型が存在する場合に、その制限酵素による切断パターンからいずれの型であるかを簡便に決定する方法である(D. E. Harry, et al., Theor Appl Genet (1998) 97:327-336)。

【0027】PCRの錆型として使用する被検定イネゲノムのDNAは、Edwardsら(Nucleic Acids Res. 8(6): 1349, 1991)の方法で簡易に抽出することができる。より好ましくは、標準的な方法により精製したDNAを用いるのがよい。CTAB法(Murray M. G., et al., Nucleic Acids Res. 8(19):4321-5, 1980)は、特に好ましい抽出法である。PCRを行うための錆型として使用するDNAの濃度は、終濃度で0.5ng/μlが好ましい。

【0028】PCRの方法はよく知られている。例えば、錆型として使用するゲノムDNA50ng、dNTP各200μM、ExTaqTM(TAKARA)5Uを使用し、例えば、94°Cにて2分を1サイクル行った後、94°Cにて1分、58°Cにて1分、72°Cにて2分を1サイクルとして30サイクル行い、最後に72°Cにて2分を1サイクル行うことにより行うことができる。ある*

*いは、94°Cにて2分を1サイクル行った後、94°Cにて1分、58°Cにて1分、72°Cにて1分を1サイクルとして30サイクル行い、最後に72°Cにて2分を1サイクル行うことにより行うこともできる。あるいは、別の態様においては、94°Cにて2分を1サイクル行った後、94°Cにて30秒、58°Cにて30秒、72°Cにて30秒を1サイクルとして35サイクル行い、最後に72°Cにて2分を1サイクル行うことにより行うこともできる。

【0029】得られたPCR産物を、制限酵素断片長多型10に関して調べるため、それぞれのPCRマーカーに存在する制限部位に対応する制限酵素で切断する。この切断は、用いる制限酵素の推奨反応温度で数時間～一昼夜インキュベーションすることにより行う。制限酵素で切断したそれぞれの増幅PCRサンプルは、例えば約0.7%ないし2%アガロースゲルあるいは約3%のMetaPhorTMアガロースゲルで電気泳動することにより解析する。例えば、ゲルをエチジウムプロマイド中紫外線下で可視化する。

【0030】可視化されたゲル上に、使用したプライマ一对に応じて、次のようなバンドが存在するか確認する。

【0031】

【表1】

検出されるバンドの
おおよそのサイズ(bp)

プライマー対1によるマーカー1の検出(R1877 EcoRI)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 1500及び1700

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 1500、1700及び3200

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 3200

プライマー対2によるマーカー2の検出(G4003 HindIII)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 362

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 95、267及び362

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 95及び267

プライマー対3によるマーカー3の検出(C1361 MwoI)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 50及び107

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 25、50、79及び107

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 25、50及び79

プライマー対4によるマーカー4の検出(G2155 MwoI)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 25、27及び78

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 25、27、78及び105

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 25及び105

プライマー対5によるマーカー5の検出(G291 MspI)

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 25、49及び55

被検定イネゲノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 25、49、55及び104

被検定イネグノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 25及び104

プライマー対 6 によるマーカー 6 の検出(R2303 Bs1I)

被検定イネグノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 238 、 655 及び679

被検定イネグノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 238 、 655 、 679
及び1334

被検定イネグノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 238 及び1334

プライマー対 7 によるマーカー 7 の検出(S10019 BstUI)

被検定イネグノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 130 、 218 及び244

被検定イネグノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 130 、 218 、 244
及び462

被検定イネグノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 130 及び462

プライマー対 8 によるマーカー 8 の検出(S10602 KpnI)

被検定イネグノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 724

被検定イネグノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 117 、 607 及び724

被検定イネグノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 117 及び607

プライマー対 9 によるマーカー 9 の検出(S12564 Tsp509I)

被検定イネグノムがRf-1遺伝子をホモに有する場合： 41及び117

被検定イネグノムがRf-1遺伝子をヘテロに有する場合： 26 、 41 、 91 及び117

被検定イネグノムがRf-1遺伝子を持たない場合： 26 、 41 及び91

【0032】

【発明の効果】(1) 本発明の方法は、PCR-RFLP法を用い、検出しようとするマーカーのDNAをPCRにより増幅するため、サザンプロット解析を行わずに、短時間で簡便に検出することができる。サザンプロット解析を行うRFLP法と比較して、PCR-RFLP法において使用するDNAの量は数ナノグラム程度と極めて少量でもよいという利点もある。また、使用するDNAの精製度は、それほど高くなくともよく、DNAの粗抽出液をそのまま使用することもできる。本発明においては、検出するPCRマーカーの存在をより確実に調べるため、PCR-RFLP法と配列決定とを組み合わせて使用してもよい。

【0033】(2) 本発明のPCRマーカーは、全て共優性マーカーである。共優性マーカーとは、ヘテロ個体と優性ホモ個体を識別することができるマーカーのことをいう。ヘテロ遺伝子型個体同士を交配して得られた交雑体の遺伝子型分離比を検出する場合、優性遺伝子を保有しているか否かのみを識別することができるマーカーである。優性マーカーを使用したのでは、優性形質を有する個体と劣性形質を有する個体とを3:1の比率で区別するしかできないのに対して、共優性マーカーを使用する場合には、優性ホモ個体：ヘテロ個体：劣性ホモ個体を1:2:1の比率で検出することができる。したがって、本発明で開示された9種類の共優性マーカーのうち、Rf-1遺伝子座を挟むように存在する2種の共優性マーカーを使用して、その遺伝子型を識別することにより、導入す

る遺伝子であるRf-1遺伝子の遺伝子型を、ホモかヘテロか（すなわち、Rf-1/Rf-1、Rf-1/rf-1、またはrf-1/rf-1のいずれであるか）まで正確に識別することができる。

【0034】例えば、PCRマーカーS12564 Tsp509IとC1361 MwoIを用いる検定を例に説明すると、Rf-1遺伝子座の遺伝子型がヘテロである場合には、Rf-1遺伝子は制限酵素Tsp509Iで切断されないS12564マーカー領域および制限酵素MwoIで切断されないC1361マーカー領域と連鎖しており、もう一方のアリル上に存在するrf-1遺伝子は制限酵素Tsp509Iで切断されるS12564 Tsp509Iマーカーおよび制限酵素MwoIで切断されるC1361 MwoIマーカーと連鎖している。その結果、それぞれのマーカーについてPCRを行うことにより、S12564マーカーについては制限酵素Tsp509I部位に多型を有する二種類のPCR生成物が増幅され、そしてC1361マーカー領域については制限酵素MwoI部位に多型を有する二種類のPCR生成物が増幅される。それぞれの二種類ずつのPCR生成物を対応する制限酵素を用いて切断することにより、ホモ型の場合と比較して異なる制限酵素断片パターンが示される。

【0035】(3) PCRマーカー座S12564 Tsp509IとC1361 MwoIとは、第10染色体上でRf-1遺伝子座を挟むように存在し、かつPCRマーカー座S12564 Tsp509IおよびC1361 MwoIとRf-1遺伝子との遺伝距離が、それぞれ0.1 cM (約30 kbpsに相当する) および0.2 cM (約60 kbpsに相当する) と近接する。減数分裂時に1個所で乗り換えが

起こるとその周辺では乗り換えが生じにくくなるキアズマ干渉を考慮すると、0.3cmのマーカー座間距離しか離れていない両マーカー座間で二重乗り換えが起こる可能性はほとんど考えられない。したがって、両マーカー座の遺伝子型を調査することにより、その間に位置するRf-1遺伝子座の遺伝子型を正確に推定できることが示される。

【0036】なお、本明細書において、遺伝距離はcm（センチモルガン）を単位として記載する。1cmとは、組換え率が1%である遺伝的距離、すなわち、全配偶子の1%が2遺伝子座間において組換えを生じるような遺伝的距離である。組換えを起こす確率は種ごとに大きく異なるため、1 cMに対応する塩基対数は種ごとに異なる。本発明で使用するイネの場合には、染色体上の位置によっても異なるが、平均すると、1 cMはDNAの約300 kbpsに相当することが知られている。

【0037】(4) 前述したように、本発明に開示するRf-1遺伝子座と密接に連鎖する2種のPCRマーカーS12564 Tsp509I座とC1361 MwoI座は、マーカー座間距離にして0.3 cMしか離れていない。この性質を利用することにより、Rf-1遺伝子ドナー親から導入する染色体領域を1 cM程度にすることができる。その結果、ドナー親のRf-1遺伝子近傍に劣悪遺伝子が存在しても、Rf-1遺伝子と同時に導入される劣悪遺伝子を効率よく識別することができるため、そのような劣悪遺伝子が回復系統に導入されてしまう可能性を非常に低くすることができる。したがって、本発明のPCRマーカーS12564 Tsp509I座とC1361 MwoI座を利用することにより、30 cM以上の地図距離を有する従来のマーカー座G291座およびG127座を使用する場合と比較して、劣悪遺伝子が導入される可能性を1/30以下に減少することができる。

【0038】(5) 本発明の別の態様においては、本発明のPCRマーカーは、ジャポニカ米とインディカ米とを区別するために使用することもできる。上述したように、本発明のPCRマーカーは、ジャポニカ米とインディカ米との間で制限酵素部位の配列に塩基多型が存在することを利用して、両種を識別することができるマーカーである。例えば、種糲の中にジャポニカ米とインディカ米が混在すると、栽培した結果所望の品種の米を収穫することができなくなるなど、ジャポニカ米とインディカ米とを区別することは重要になる。本発明の方法では、数ナノグラム程度のDNAを用いてPCRマーカーの増幅を行うことができるため、種糲1粒ごとに識別することができる。

【0039】

【実施例】本発明を以下の実施例において説明するが、これらは本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するためのものではない。

【0040】実施例1 Rf-1 遺伝子座周辺RFLPマーカーのPCRマーカー化

本実施例においては、Rf-1遺伝子座周辺RFLPマーカー9個（R1877、G291、R2303、S12564、C1361、S10019、G4003、S10602、G2155）をPCRマーカー化した。

【0041】(1) 材料および方法

Rf-1遺伝子座周辺RFLPマーカー9個（R1877、G291、R2303、S12564、C1361、S10019、G4003、S10602、G2155）を農林水産省農業生物資源研究所から購入し、ベクター内の挿入塩基配列を決定した後、以下の手順で実験を行った。なお、本文中のイネ品種のうち、あそみのり、コシヒカリおよび日本晴はジャポニカ米であり、IR24およびKasalathはインディカ米である。

【0042】(2) あそみのりゲノミックライプラリーの作製

あそみのり緑葉から、CTAB法によりトータルDNAを抽出した。MboIで部分消化後、NaCl密度勾配遠心（6~20%直線勾配、20°C、37000 rpm、4時間、全容量12ml）によりサイズ分画を行った。各分画（約0.5 ml）の一部を電気泳動にかけ、15~20kbのDNAを含む分画を選抜・精製した。ライプラリーの作製は、Lambda DASH II (Stratagene) をベクターに用いて、付属プロドコールに準拠して行った。パッケージングには、Giga Pack III Gold (Stratagene) を用いた。パッケージング後、SM Buffer 500 μlおよびクロロフォルム20 μlを添加した。遠心後の上清にクロロフォルム20 μlを添加し、ライプラリー溶液とした。

【0043】ライプラリー溶液の50倍希釈液5 μlを用いて、XL-1 Blue MRA (P2)に感染させた結果、83個のプラーカーが出現した。ライプラリーあたりでは、 4.15×10^5 pfuとなり、平均挿入断片長を20 kbとすると、 8.3×10^9 bpをカバーする計算になる。イネゲノム (4×10^8 bp) に対して十分な大きさのライプラリーであると考えられた。

【0044】(3) R1877、C1361およびG4003対応ゲノミッククローニングの単離

C1361およびG4003については、RFLPマーカープローブを含むプラスミドを単離した後、制限酵素処理・電気泳動により、RFLPマーカープローブ部分を分離し、DNA回収・フィルター (Takara SUPREC-01) を用いて目的のDNAを回収した。R1877については、マーカープローブ両端部に対してプライマーを設計し、あそみのりトータルDNAをテンプレートにPCRを行い、産物を電気泳動後、前述の方法で回収した。回収したDNAは、rediprime DNA labelling system (Amersham Pharmacia) を用いてラベルし、ライプラリースクリーニング用プローブとした。なお、PCRは常法により行った（以下、同様）。

【0045】ライプラリーのスクリーニングは、プラーカーをHybond-N+ (Amersham Pharmacia) にプロットした後、常法により行った。1stスクリーニング後、陽性プラーカー周辺を打ち抜き、SMバッファーに懸濁し、2ndスクリーニングに供試した。2ndスクリーニング後、陽性

プレークを打ち抜き、さらに3rdスクリーニングを行い、単一プレークを分離した。

【0046】分離した目的プレークをSMバッファーに懸濁後、プレートライセート法によりファージを一次増殖した。得られたファージ増殖液を用いて、振とう培養法により二次増殖を行った後、Lambda starter kit (QIAGEN) を用いてファージDNAを精製した。

【0047】各マーカーについて、8枚のプレートを用いて1stスクリーニングを行った。プレート1枚につきライプラリー溶液を10 μ l 使用した。3rdスクリーニングまで行った結果、R1877、C1361およびG4003対応ゲノミッククローンを、それぞれ、4個、3個および3個単離した。

【0048】(4) R1877のPCRマーカー化

単離したゲノミッククローンを解析し、RFLPの原因部位、即ち、IR24には存在しあそみのりには存在しないEcoRI部位を同定することにより、PCRマーカー化を行った。

【0049】単離した4クローンについて以下の解析を行った。まず、T3およびT7プライマーを用いて、各クローンの挿入断片の両末端の塩基配列を明らかにした。

【0050】つぎに、マーカープローブ両端部に対して外向きのプライマーを設計し、T3およびT7プライマーと組合せ（合計4プライマー組合せ）、各クローンをテンプレートにPCRを行った。

【0051】また、各クローンをNotIおよびEcoRIで消化した後、電気泳動することにより、挿入断片長および各EcoRI断片長を推定した。これらの解析の結果、各クローンの位置関係を明らかにすることことができた。RFLP解析ではマーカープローブRI877により日本晴では20 kb、Kasalathでは6.4kbのEcoRI断片が検出されること（ftp://ftp.staff.or.jp/pub/geneticmap98/parentsouthern/chr10/R1877.JPG）と併せ考えることにより、IR24には存在しあそみのりには存在しないEcoRI部位のおおよその位置が推定できた。そこで、その周辺を増幅するように設計したプライマー組合せ（SEQ ID NO:1×SEQ ID N 0:2）を用いて、94°Cにて1分、58°Cにて1分、72°Cにて2分を1サイクルとし30サイクルのPCR条件にてゲノミックPCRを行った。得られたPCR産物をEcoRI処理した後、0.7%アガロースゲルで電気泳動した。その結果、あそみのり-IR24間で期待通りの多型が観察された。すなわち、PCR産物（約3200bp）のEcoRI処理により、IR24では1500 bpと1700bpとに切断されるのに対し、あそみのりでは切断されなかった。あそみのり-IR24のRIL（Recombinant Inbred Line）を用いてこのPCRマーカーをマッピングした結果、RFLPマーカー座R1877と同一領域に位置づけられ、RFLPマーカーR1877がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはR1877 EcoRIと命名した。

【0052】(5) G4003のPCRマーカー化

単離したゲノミッククローンを解析し、RFLPの原因部位、即ち、あそみのりには存在しIR24には存在しないHindIII部位を同定することにより、PCRマーカー化を行った。

【0053】R1877と同様の解析を行い、単離した3クローンの位置関係を明らかにした。RFLP解析ではマーカープローブG4003により日本晴では3kb、Kasalathでは10kbのHindIII断片が検出されること（ftp://ftp.staff.or.jp/pub/geneticmap98/parentsouthern/chr10/R1877.JPG）

10 と併せ考えることにより、あそみのりには存在しIR24には存在しないHindIII部位が、2個の候補部位のいずれかであると推定された。そこで、各HindIII部位周辺を増幅するように設計したプライマー組合せを用いて、94°Cにて30秒、58°Cにて30秒、72°Cにて30秒を1サイクルとし35サイクルの条件で、ゲノミックPCRを行った。得られたPCR産物をHindIII処理後、2%アガロースゲルで電気泳動したところ、マーカープローブ内部のHindIII部位が多型部位であることが示された。すなわち、PCR産物（362bp）のHindIII処理により、あそみのりでは95bpと267bpとに切断されるのに対し、IR24では切断されなかつた。多型部位を増幅するためのプライマーはSEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:4である。マッピングの結果、RFLPマーカーG4003がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはG4003 HindIII（SEQ ID NO:19）と命名した。

【0054】(6) C1361のPCRマーカー化

単離したゲノミッククローンの塩基配列情報に基づいてプライマーを設計した。あそみのり、コシヒカリ、KasalathおよびIR24のトータルDNAをテンプレートにPCRを行い、産物を電気泳動後、既述の方法で回収した。回収したDNAをテンプレートに用いて、ABI Model 310により各品種の塩基配列を解読し、多型作出に利用可能な変異を探索した。

【0055】R1877と同様の解析を行い、単離した3クローンのおおよその位置関係を明らかにすることはできた。しかし、C1361マーカー周辺にはPCR増幅しにくい領域や塩基配列を解読できない領域が存在することが明らかになり、RFLP原因部位を同定することは困難であると考えられた。そこで、比較的長いPCR産物（2.7kb）が得られる領域に着目し、dCAPS化を試みることにした。あそみのり、コシヒカリ、Kasalath、IR24を用いて、同領域のゲノミックPCR産物の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米-インディカ米間で多型を示す部位を6ヶ所見出すことができた。そのうちのひとつについて、dCAPS化を行った。この過程で、プライマーとしてSEQ ID N 0:5およびSEQ ID NO:6を用い、94°Cにて30秒、58°Cにて30秒、72°Cにて30秒を1サイクルとし35サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をMwoI処理後、3%MetaPhorTMアガロースで電気泳動することにより解析した。あそみのりでは2箇所で切断され、約25bp、50b

20 40 50

p、79bpのバンドが観察され、IR24では1箇所で切断され、約50bp、107bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーC1361がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはC1361 MwoI (SEQ ID NO:20) と命名した。

【0056】(7) G2155のPCRマーカー化

マーカープローブ両端部に対してプライマーを設計し、あそみのり、コシヒカリ、IR24およびIL216(戻し交雑によりコシヒカリにRf-1遺伝子を導入した系統、遺伝子型はRf-1/Rf-1)のトータルDNAをテンプレートにPCRを行った。PCR産物の精製および多型作出に利用可能な変異の探索は、既述の方法で行った。

【0057】供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、Rf-1遺伝子保有品種・系統 (IR24およびIL216) - Rf-1遺伝子非保有品種 (あそみのりおよびコシヒカリ) 間の変異が3ヶ所見出された。そのうちのひとつを利用して、dCAPS化を行った。この過程で、プライマーとしてSEQ ID NO:7およびSEQ ID NO:8を用い、94°Cにて30秒、58°Cにて30秒、72°Cにて30秒を1サイクルとし35サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をMwoI処理後、3%MetaPhorTMアガロースで電気泳動することにより解析した。あそみのりでは1箇所で切断され、約25bp、105bpのバンドが観察され、IR24では2箇所で切断され、約25bp、27bp、78bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーG2155がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはG2155 MwoI (SEQ ID NO:21) と命名した。

【0058】(8) G291のPCRマーカー化

マーカープローブ内部配列に対してプライマーを設計し、種々のプライマー組合せでPCRを行い、期待される大きさの増幅産物が得られるプライマー組合せを探索した。探索により見出したプライマー組合せで、あそみのり、コシヒカリ、IR24およびIL216のトータルDNAをテンプレートにPCRを行った。PCR産物の精製および多型作出に利用可能な変異の探索は、既述の方法で行った。

【0059】マーカープローブ配列に対して設計したプライマーを用いて、供試品種のゲノミックPCRを行い、産物の塩基配列を比較した。その結果、Rf-1遺伝子保有品種・系統 (IR24およびIL216) - Rf-1遺伝子非保有品種 (あそみのりおよびコシヒカリ) 間の変異が4ヶ所見出された。そのうちのひとつを利用して、dCAPS化を行った。この過程で、プライマーとしてSEQ ID NO:9およびSEQ ID NO:10を用い、94°Cにて30秒、58°Cにて30秒、72°Cにて30秒を1サイクルとし35サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をMspI処理後、3%MetaPhorTMアガロースで電気泳動することにより解析した。Rf-1遺伝子保有品種・系統では2箇所で切断され、約25bp、49bp、55bpのバンドが観察され、Rf-1遺伝子非保有品種では1箇所で切断され、約25bp、104bpのバンドが

観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーG291がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはG291 MspI (SEQ ID NO:22) と命名した。

【0060】(9) R2303のPCRマーカー化

マーカープローブ内部配列に対してプライマーを設計し、あそみのり、IR24およびKasalathのトータルDNAをテンプレートにPCRを行った。産物の精製および多型作出に利用可能な変異の探索は、既述の方法で行った。

10 【0061】供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米-インディカ米間の変異が見出された。この変異は、BslI認識部位に生じていたので、そのままCAPSマーカーとした。この過程で、プライマーとしてSEQ ID NO:11およびSEQ ID NO:12を用い、94°Cにて1分、58°Cにて1分、72°Cにて2分を1サイクルとし30サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をBslI処理後、2%アガロースで電気泳動することにより解析した。ジャポニカ米では1箇所で切断され、約238bp、1334bpのバンドが観察され、インディカ米では2箇所で切断され、約238bp、655bp、679bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーR2303がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはR2303 BslI (SEQ ID NO:23) と命名した。

【0062】(10) S10019のPCRマーカー化

S10019のPCRマーカー化は、R2303のPCRマーカー化の方法にしたがって行った。

【0063】供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米-インディカ米間の変異が見出された。この変異は、BstUI認識部位に生じていたので、そのままCAPSマーカーとした。この過程で、プライマーとしてSEQ ID NO:13およびSEQ ID NO:14を用い、94°Cにて1分、58°Cにて1分、72°Cにて1分を1サイクルとし30サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をBstUI処理後、2%アガロースで電気泳動することにより解析した。ジャポニカ米では1箇所で切断され、約130bp

、462bpのバンドが観察され、インディカ米では2箇所で切断され、約130bp、218bp、244bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーS10019がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはBstUI (SEQ ID NO:24) と命名した。

【0064】(11) S10602のPCRマーカー化

S10602のPCRマーカー化は、R2303のPCRマーカー化の方法にしたがって行った。

【0065】供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米-インディカ米間の変異が見出された。その変異を利用して、CAPS化を行った。この過程で、プライマーとしてSEQ ID NO:15およびSEQ ID NO:16を用い、94°Cにて1分、58°Cにて1分、72°Cにて1分を1サイクルとし33サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をKpnI処理後、2%アガロースで電気泳動す

ることにより解析した。ジャポニカ米では1箇所で切断され、約117bp、607bpのバンドが観察され、インディカ米では切断されず、724bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーS10602がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはS10602 KpnI (SEQ ID NO:25) と命名した。

【0066】(12) S12564のPCRマーカー化

S12564のPCRマーカー化は、R2303のPCRマーカー化の方法にしたがって行った。

【0067】供試品種の対応領域の塩基配列を比較した結果、ジャポニカ米-インディカ米間の変異が見出された。その変異を利用して、dCAPS化を行った。この過程で、プライマーとしてSEQ ID NO:17およびSEQ ID NO:18を用い、94°Cにて30秒、58°Cにて30秒、72°Cにて30秒を1サイクルとし35サイクルのPCR条件にてPCRを行った。得られたPCR産物をTsp509I処理後、3%MetaPhorTMアガロースで電気泳動することにより解析した。ジャポニカ米では2箇所で切断され、26bp、41bp、91bpのバンドが観察され、インディカ米では1箇所で切断され、41bp、117bpのバンドが観察された。マッピングの結果、RFLPマーカーS12564がPCRマーカーに変換されたことが証明され、このマーカーを本発明においてはTsp509I (SEQ ID NO:26) と命名した。

【0068】実施例2 Rf-1遺伝子座のマッピング

MSコシヒカリにMS-FRコシヒカリの花粉をかけて作成したF1集団1042個体の幼苗からDNAを抽出し、分析に供試 *

表2 Rf-1座近傍組換え個体のマーカー座遺伝子型

Locus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
R1877 EcoRI	J	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
G291 MspI	H	J	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
R2303 BstI	H	H	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
S12564 Tsp509I	H	H	H	H	H	H	H	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
C1361 MwoI	H	H	H	H	H	H	H	H	J	J	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
S10019 BstUI	H	H	H	H	H	H	H	H	J	J	J	J	J	J	J	J	H	H	H	H	H	H	H
G4003 HindIII	H	H	H	H	H	H	H	H	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J
S10602 KpnI	H	H	H	H	H	H	H	H	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J
G2155 MwoI	H	H	H	H	H	H	H	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J
24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	
H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	H	H
J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J	J

J コシヒカリ型ホモ

H コシヒカリ型/MS-FRコシヒカリ型ヘテロ

【0072】本発明において、Rf-1遺伝子座と密接に連鎖するマーカー座の遺伝子型を検定するために、Rf-1遺伝子座を挟む位置関係にある新規の共優性PCRマーカーS12564 Tsp509IとC1361 MwoIを含む、9個の新規の共優性PCRマーカーを開発した。これらの新規の共優性PCRマーカーによりRf-1遺伝子座の遺伝子型を、簡便かつ正確に推定する方法を提供することができる。本発明のPCRマ

ーカーを使用すると、ジャポニカ米-ジャポニカ米ハイブリッドライスの育成に利用されているBT型雄性不稔細胞質に対するRf-1遺伝子の有無の調査およびRf-1遺伝子ホモ型個体の選抜を、簡便かつ正確に実施できた。したがって、本発明のPCRマーカーは効率的にハイブリッドライスの育成に利用することができる。さらに、本発明の方法では、遺伝子型をDNA配列から直接的に検出する

* した。ここで、MSコシヒカリとは、細胞質をBT型雄性不稔細胞質に置換したコシヒカリである（世代:BC10F1）。また、MS-FRコシヒカリとは、IR8に由来するRf-1遺伝子をMSコシヒカリに導入した系統である（Rf-1遺伝子座へテロ）。

【0069】まず、Rf-1遺伝子座を挟むと考えられる2個のマーカー座R1877 EcoRIおよびG2155 MwoIにおける各個体の遺伝子型を調査した。R1877 EcoRI座またはG2155 MwoI座に関してジャポニカ米型ホモ個体を、これら2個のマーカー座間での組換え体とみなした。つぎに、各組換え体について、G291 MspI座、R2303 BstI座、S12564 Tsp509I座、C1361 MwoI座、S10019 BstUI座、G4003 HindIII座およびS10602 KpnI座の遺伝子型を調査し、組換え位置を同定した。

【0070】R1877 EcoRI座およびG2155 MwoI座に関する遺伝子型調査の結果、46個体がRf-1遺伝子座付近での組換え体であることが明らかになった。これら組換え体について、Rf-1遺伝子座近傍マーカー座の遺伝子型を調査した結果を表2に示す。上記交配において、BT型雄性不稔細胞質を持つ個体では、Rf-1遺伝子をもつ花粉のみが受精能力を持つとの報告(C. Shinjyo, JAPAN. J. GENETICS Vol. 44, No. 3:149-156(1969))に基づいて、Rf-1遺伝子座を詳細連鎖地図上に位置づけることができた(図1)。

【0071】

【表2】

ため、環境要因の影響を受けることなく、Rf-1遺伝子座 *【0073】
の遺伝子型を決定することができる。 *【配列表】

<110> JAPAN TOBACCO INC.

<120> A method for genotyping the locus which is involved in restoration
of the rice BT type cytoplasmic male sterility.

<130> 991698

<160> 26

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of R1877 EcoRI marker sequence.

<400> 1

cattcctgtc tccatggaaa cgtc

24

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of R1877 EcoRI marker sequence.

<400> 2

ctctttctgt atacttgagc tttgacatct gac

33

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of G4003 HindIII marker sequence.

<400> 3

gatcgacgag tacctgaacg

20

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of G4003 HindIII marker sequence.

<400> 4

aatagttgga ttgcctcaa aggg

24

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of C1361 MwoI marker sequence.

<400> 5

aaagcaaccg acttcagtgg catcacc

27

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

23

24

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of C1361 MwoI marker sequence.

<400> 6

ctggacttca tttccctgca gagc

24

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of G2155 MwoI marker sequence.

<400> 7

gaccaccaat taactgatta agctggc

27

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of G2155 MwoI marker sequence.

<400> 8

tttctggctc caataatcag ctgttagc

27

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of G291 MspI marker sequence.

<400> 9

ctgctgcagc aagctgcacc gaaccgg

27

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of G291 MspI marker sequence.

<400> 10

acattttttc ttccgaaact tccg

24

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<223> Oligonucleotide primer for amplification of R2303 BslI marker sequence.

<400> 11

atggaaagat acactagaat gagc

24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

25
<223> Oligonucleotide primer for amplification of R2303 BstII marker sequence.
<400> 12
atcttatata gtggcaggaa agcc
<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<223> Oligonucleotide primer for amplification of S10019 BstUI marker sequence.
<400> 13
aacaatctta tcctgcacag actg
<210> 14
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<223> Oligonucleotide primer for amplification of S10019 BstUI marker sequence.
<400> 14
gtcacataga agcagatggg ttcc
<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<223> Oligonucleotide primer for amplification of S10602 KpnI marker sequence.
<400> 15
agctgttagag agttctatgc cacc
<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence
<223> Oligonucleotide primer for amplification of S10602 KpnI marker sequence.
<400> 16
tagccatgca acaagatgtc atac
<210> 17
<211> 26
<212> DNA
<213> artificial sequence
<223> Oligonucleotide primer for amplification of S12564 Tsp509I marker sequence.
<400> 17
ctagtttagac cgaataactg aggttc
<210> 18
<211> 27
<212> DNA
<213> artificial sequence
<223> Oligonucleotide primer for amplification of S12564 Tsp509I marker sequence.

27	28
<400> 18	
tttgggggt tggcattt agaaaat	27
<210> 19	
<211> 2240	
<212> DNA	
<213> Oryza sativa L.	
<223> PCR marker G4003 HindIII	
<400> 19	
gccccgcgtc cggaaagtgc agcgaggatcg cggccctgac gcccgtacgc tcggcgagcc 60	
gcagcggcgt ctctggcggt gtgaaggaca gcccgttcag cgtcgccgg cggccggcgt 120	
tgtatcgtaac cggccggcgt ctccgcagca ggtacgcctg cgtcacgtt atcgacgagt 180	
acctgaacca tccctgtggg ttccgcctcg ccgcgtccggc actcaggatc caccgtccca 240	
atgcaaaaaa ccaaaaccca aaagcttaat gcgaataata catcattca cgtattaa 300	
aaaataattt ataggtaaaa ttttataat gtatttttagc gacgtaatg tcaatgctga 360	
gaaataaaacg ataataactt aaatgaagtt ctaaaatata aattttggca tcgggtatgt 420	
ttggataaag aaaacgtgg aggctagtaa tttttctct ttttaagta tctagattgt 480	
catatattga attttcagt ttttcatccc ttggaggaca atccaaactat tattttcctt 540	
ttcttatgtt aaaggttggaa caacatattc aaacataaaa aaataaaaattt aaatgaaata 600	
aattttacaat tcataaaatt tacagaattt atgtaagaa aattttcaaa cttagataat 660	
aataaaagcaa caaaatcgta ctaaaaagaa gtataattgt acattgtata ctactactcc 720	
tacaattttt gacttagaat ttttatttc ctgaaatcta gtaatgccc ttttttttt 780	
ctagttgaac cagacagtaa gtttaactcg aaacttataa gctaattgacg gaagtcggc 840	
aatttactcg tacctgacgg agcgagctt gttcatggag aaggacttgc cgaactggc 900	
ctggggaggg tcggggagcg ggccggaggc ccgcggccgg gagttggagt agcgaggac 960	
ggcgacccgc gcgacccggc gcccacacggt gtcgttaccat atgcgcgcgc tggcgcac 1020	
gtagtagtcg gagctcgct tctggcggt ggtgacgagg aaggagtagg actggccgac 1080	
gtggacgtcc aggttgggt agttctgcg cgtcgtag gagccctccg tctccaccag 1140	
caccatgtt tgccccctgaa tcctgaagtt gaggctcgac gacgtccccca cttgtgcac 1200	
tcggatctt tacgtcttgc ctgtgtcccc acaccgacgt cgccgacaca cgcgcacaaag 1260	
ataatagact cattgttaat aggttagtaac cttctccgtt tcattttata aatcgtttga 1320	
ttatattttt gttttttttt ctttttttaag tttttttttt ataaacttaa ttaaatctaa 1380	
agaattttaa taaaaaaaat caaacgactt ataataaaa atggatggag tagttgcac 1440	
aattttgtgaa tgaagcaac aagattataat cttttcatg agggtaaag tattcagtga 1500	
acaattcgtc agttcaagt ttcatgaaat cggacagggt ctctgaaagt ctgtatttt 1560	
ggtaactgtt gattgactac tctggcttct gttgtcacat cttttgtatc ctgtttcgg 1620	
taaaaaaaaat ttggcattt ttactcctat cttttgtatc tttaactgaa accattgtat 1680	
gatataactac tagcagacaa aactggtaa aattcagcg aatgaacttt ttgtcagtt 1740	
agcatttagcg gacagcttca gtaagcagag caggctgcct taaggcttaa agcactatct 1800	
tccacaacac ttgtcttac aatcaaattt cttttttactt atcacaaaaaa gcaaggaaac 1860	
taactaaacc ttactccttac tagtactact gctatgacta tggaaacaaga ttccaaatcca 1920	
agaaaaacac agtgctcgat cggatgataa aacggatcgaa aacggcttc tccagctgcc 1980	
aaaatggcac cccactgact ctacgtacgt actaacttgc gacgctgtt aaaaactagcc 2040	
gttagtacaga gaagaggacc caaagtttcg tccaaatattt tattttaccc ggttccacat 2100	
tgtatggcttc gtactcgat cggccgggaa caaggcttc gttgtacgt tacggccct 2160	
tgccgttaat cggccatcc cccactgact cttttttttt ggttccacat 2220	
tcagatccctg caacgtttttt 2240	
<210> 20	
<211> 2601	
<212> DNA	
<213> Oryza sativa L.	

29

30

<223> PCR marker C1361 MwoI

<400> 20

tccttgctgag atccaaatgg cggtaactt gccccttct tttttcttc tcttctgaat 60
 tttttcatgg tttttggag agatttcgt aacttgatta cagttctagg aaaaggccac 120
 ctgttcaaa cagggtttc ttgaaaggga tcaatttgcgt aggagtacat gattctaaaa 180
 gcgattcga aataaaacac agttctcgat ctcatacctg aaaacaaaag gcccatactg 240
 tgtaaactgt gattatgctt ctgtttaatgg ggtatattgt acaaaaatgtg cgccaaaccac 300
 ctataaacag attgtgagct ttatcttag taaaataaaa tgtgacattc tactcagtgt 360
 tcagtgtatcc gatgtcgatctt ctgtcgatca caacttctaa cagccgtttt cggttagtaca 420
 aactagcgaa acaccaaaaaa cgcgcattt gagttctgga atacgctgaa attgttagaa 480
 tcaaccacga aaccaaaaatc attgttgcaga aacgttgcgg aagataaaaa cacaagaact 540
 tgtttaaca aagcatatcg acagttacata tacggttaca acaccagtc ttatatacg 600
 tctgtggag ttccatctac tggctgtcat tgatcttag gacagacagg ttaacatagg 660
 tacaacacaa ttacaggcta aaccgaagcg aactacactg tcagcatctc taacagtatc 720
 gtcaagcaag ctatattaca gctgctctag taaaattaca acgtccctgg cagaatccct 780
 ctgtttctg gcagcgcacga ggcacggtcc atggccttag caggacatct caccgcgtc 840
 ctgcatacgaa agcaacccgac ttcaatggaa tcacccctgt ctcctgcggaa aaagttgggt 900
 cgatcaatca cgcgttataat cccaaacaaa atgggttataattatgtatccatgtatgaa 960
 tacccatcgat ttctcttattt gctctcgagg gaaatgtatccatgtatgaaac agttctcaag 1020
 cacccatcgatcc ctcttcatcc atgtttgtt tgcttcaatg gcttcgtatccatgtatgaa 1080
 catctgcgtatccatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaacaca acaaataatt 1140
 gaagcaggcgcacatccatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaacaca acaaataatt 1200
 agataaagaa atgggttgggtt ttccatcgatcc atctccctca acatggatccatgtatgaa 1260
 gcatctgtgggg caaaggatgg atgtttatccatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 1320
 attgtttttt ccctgttccatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 1380
 ccagtcacatccatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 1440
 gtcattggatccatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 1500
 tgttttgtt gaaatgtatccatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 1560
 gagaactgtatccatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 1620
 tcaaatgtatccatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 1680
 gtcattggatccatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 1740
 taacttaccatccatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 1800
 aaggtagctatccatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 1860
 gcagcaaggcgcacatccatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 1920
 acttgaagat tggatccatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 1980
 tggccggatccatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 2040
 ttctttccatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 2100
 ataggaaaggatccatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 2160
 ttgacaatggatccatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 2220
 tcctgtccatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 2280
 cataacatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 2340
 tcctttatccatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 2400
 acatgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 2460
 gtgcctttatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 2520
 tcgttcgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 2580
 gggcccttctcgccgcgtatccatgtatgaaac agttctcaatgtatgaaac agttctcaatgtatgaa 2601

<210> 21

<211> 1333

<212> DNA

<213> Oryza sativa L.

31

32

<223> PCR marker G2155 MwoI

〈400〉 21

〈210〉 22

〈211〉 863

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L.

<223> PCR marker G291 MspI

<400> 22

cgaaaggat caaaaatgaa cgacgaggc atttagaagg agaggaattt tattttttcc 60
cggtatttaa ttttaaattt tgtggcgaa agttcgaa gaaaaatgt gctcatgagt 120
gattattggc tctgaacacc aacctctttt ttcgttgatt cttctgagg tttgggtgt 180
tgggacacga tgctggccgacacac cgggttccac aatacactaa tctactcgac 240
acacccat tgaactgcat ataattttt agaaagtcca ttaacacatc ttataaaacc 300
ttgttgaatc atataatcat tctataaagt ctatttgaac atcttatgaa aaaataagat 360
ctgacacctg cgttacactc tcttacattt tccatttagcc taactaattc cgtgcaggaa 420

acggccaaaa ataatagtagc caatagtcctt ctaatccgtt gccagaggcc gccaatgattt	480
agtgattaaac ccaaaaaaaca taatcatcat cacacgcgcg taatgaccag ctctcgctta	540
gctcatccca caggcgcccc ccacacgcca ctcctgcccc gtggggccac ctttcacacc	600
ccccaccaac cagaaaaaaaaactcccccactttaatgtttt atctcgccgc	660
agtataaaag gcgacccccac cacccacaca caatcacagt cagcgacccca acccaaccccg	720
agccgaggag tcgagtcgtt tgaaaattac gaaattgcccc ttcgactccca ccaccacccac	780
ccacccggcgca ggcgaggaga ggagaaaaat tggggaggaaa aaaaaaggga aaaagaaaaaa	840
gggttggaggaa gatttttgcg aag	863

<210> 23

<211> 1510

<212> DNA

<213> Oryza sativa L.
<223> PCR marker R2303 BslI
<400> 23

tgccatgaag acctatggaa agaatatctt cttctcactc tgtgaatgtt gagttactc 60
tctgttaacat tttagggctag gtcgaaggaa catgaagcat tgctgattca ctccactgtg 120
ttttttttt ctgtataggg ggaaagaaaa tcctgtaca tggcaggcc gcatggtaa 180
cagctggaga acaactggcg acatcgccga caactggggc aggttctact cactctct 240
ttaaccctgt ttacatagtt cttagtattt tcagtaattgc cctgttattt 300
cagtagaca tctcgtgcag acgaaaatga ccaatgggcgt gcctatgtc gacctgggtgg 360
atggaatgtt aagaacttga gatgtatctg ttccctaggtt gettaaccat ttgagagctt 420
caaaatgtc aacatatgtt tctgctgtc aatatcagat cctgacatgc ttgaagtggg 480
aaatggtggg atgtctgaag ctgagttaccg gtcacacttc agtatctggg cactagcaaa 540
ggtaccatag catgttctat gtactaataa ttttgcgtca atgttgaact tctttgcatt 600
tcctcactgc aagttttgtt tgaattgttc aggctcttct tttgatcgga tgcgatgtgc 660
gctcaatgag ccacgacg aagaacatac tcagcaactc ggaggtgatc gctgtcaacc 720
aaggcaagcc ttccatgtt cacaatgttta gattttagcca tacctctgg atatttacc 780
atactataa tgtaactctc tgaacagata gtcttaggtt ccaaggaaag aaagtacaat 840
ctgacaacgg attggaggta tcccttcaat ggcttccaaat ttgcagttt ctcattgtcc 900
catagcctt ggcataatgtca tgactaactc tgaagctgac aatactttgtt gtaaattttgt 960
cggttaggtt gggccggcc actcagcaac aacaggaagg ctgtgggtct ctggaaacagg 1020
cagtcataacc aggcacccat cactgcacat tggcgaaca tggggctcgc tggatggc 1080
gccccactg ctctgtatct atggcggta aagccttgc tttcttccaga gctcaaaatgt 1140
gaacatcttc tcttcagaat tcaaggttca taacaaatctt ctgtcaattt tgcagcactc 1200
ttcgttgcgc gtcaggagc agatatcgc atcgggtggc cctcatgact gcaagatgt 1260
tgtcttgcaca ccaaacttagt cagcaaaagaa aagcagcaca ggttagtacg tgcggcgc 1320
atacagctaa attgtatcagg attcaggaa aagggttgca atttgcagg attggtagag 1380
ctggaaatgg gatgccattt ggttatgtat gttagaaataa gctgtaaagcc tggatggc 1440
tatgtatca gccgtcaaat gctggcgagt gtatttctga agtttgcac gaaagttgca 1500
gcaataaaaaa 1510

<210> 24

<211> 1016

<212> DNA

<213> Oryza sativa L.

<223> PCR marker BstUI

<400> 24

tggggattct tttcttaag caatttaaca ttattgtcct aacaatatac acaatattgg 60
tttttcttc agtataat aatttttta cttttggaaa cacatttgcataatgttgg 120
aacacaatta tatcttgcac ttccctttgg aaatttatc atttggaaac tgatttgcgt 180
ttcatggctg taatcttctc ttgcacat cgctttctt ttgttggcgtc tctgttgg 240
agaagagcaa ccaagtaat ttgcacat ttttttgg ctttcttaccatttgcgt 300
gttgcacaaat ccacgcacaa ggccatcccg attccgagag cgcaacccat tgccttggat 360
ggcccgacaa gggaaagagct gaaggccatg gaggcgcaga aggtcgagat cgaccgcacc 420
gccccgcgtcc aggtgcgcgg tgagcttgg ctggggctgg catacctgt cgtccagact 480
gccccgttca tgagggtcac attctggag ctctcatggg atgtcatggg acccatctgc 540
ttctatgtca cctccatgtca ttcatggcc ggctacaccc tcttcctccg gaccaagaag 600
gagccctcct tcgagggtt ctgcgagac cggttgcgg cgaaggcaga gcggttgcgt 660
caaccccccggg atttcgtatctt ccgcgttat gacgagctcc ggcgacccgt tggcctgg 720
gtgggtcgga ctccgacgag cccctgcaga ccgtcgatgt cgtcgatgtc gtcttgcac 780
caggagagcc attgcatttcc ttactgcctat tgccaatgtt ctgttgcgtt ttgttgcgt 840
ttgtcagaat ttttcatgc ccagttatgtt ggggttaaccc tagttctcc attgttaccgt 900

35

36

tctgatgtgc ggatgatgct atgcaaagca tagttgttg aagagatgac aaggcagatt 960
 ttagcttcaa aacctggagg tgagaaaaaa aaatcctgat gtgttgtgt gtgtga 1016
 <210> 25
 <211> 676
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa L.
 <223> PCR marker S10602 KpnI
 <400> 25
 accacccatca tatgaagaaa ttaacgggtt tttcatgagg aatccaacag tcgctgaatt 60
 ggtggaaact gtggaattct tcttggctga ggtaaccaat catcaactca ccacaatgca 120
 caagtttgc gcttactact acagttacttc taataagttt tgtctgtga gattttattt 180
 ctgatttcta tgcattgtca tcttttgac aggccatcca gtcttatcgt gctgagatgt 240
 aaactgagct caacccggca gctgggtgact atatagtttccggaaaggta cggccctatc 300
 ttcccatgg acatgtttct aaccataaac atatcttgc tggacttttggc 360
 tggctacact aaacttgcgtt tcattaaacct gctcaatcag gtgtcaaaca atggatggc 420
 agaagggtgaa tgccaggaga aagctggctg gttcccttac gactacatcg agaaaaggaa 480
 ccgtgtgctt gcaagtaaag tcgcccaggat cttctaggcg ttcaatgagc catacataca 540
 taaccctgtt gtgttacact gtattatgtt cttcaatgac cttctgtatca 600
 gagaaatcac aaatattttt ttgttctattt attgtcatttta tcactacccc ttttgc 660
 accagtgcac cctttt 676
 <210> 26
 <211> 1059
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa L.
 <223> PCR marker Tsp509I
 <400> 26
 gcgagatcat gaacttgatt ttctgggtgc catattggc ttgcttggta accttgc 60
 gaaggatagc cttaataggt aagtccctca catgcttccat tccatggctt caattcatat 120
 cagtttactt gttctggcag ttccctgggg tcaggactca gaaacatcca attaattttc 180
 atgttctttt aacgacttcg aaatacttta taacctctcc acagggtacg gctttcatct 240
 gcccgtgttc ctgttgcattt atctcagaat ccacagatgtt aagagacaca gagagatgtc 300
 atagcactcc tctgttctgtt attcttagca agtcaagggtt ctgttgcattt 360
 atatcaccgg taattcaaaa ttcttcaagt tccatgggtt tttttttt atctttttt 420
 aactcggcat ttattacgtt ctctttttt caaaaaggatgtt tttttttt tgctccctt 480
 cataggttcg cagaacagttt gatcttattt agaaaacaat attttgcattt taacatct 540
 ttatctatgtt gatggaaaattt aatgtatgtt taataatgtt aatgtatgtt attttgcattt 600
 tgaatccatgtt ctaccaactt tagtttagacc gaattactgtt ggttcttattt caaagaataa 660
 tttagtgcac catttgcac actactatgtt agttaaaaatgg tattccctt tatttgcattt 720
 ggggtttagtggccat tcttaatgtt atgttcttca tgccacaaac ccacaaatgg 780
 cattaaacaca tacagattt tattaaacata gctataaaattt ggatttccatgg 840
 tgaatttttt ttgttacaat tgaaaggactt gggacatcaat gcatttttt ttagttttt 900
 gtttatttgcac catttgcac actgttgcattt gtaaaacaaca ggttgcattt cattatgaca 960
 ttctatgac catttgcac actgttgcattt gtaaaacaaca ggttgcattt cattatgaca 1020
 tgcaaggagc acgggaagct gaaatgttgcattt gttttttttt 1059

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、第10染色体上でRf-1遺伝子座をマー

カーとの関係で連鎖地図上に位置づけた、遺伝子地図を
表したものである。

【図1】

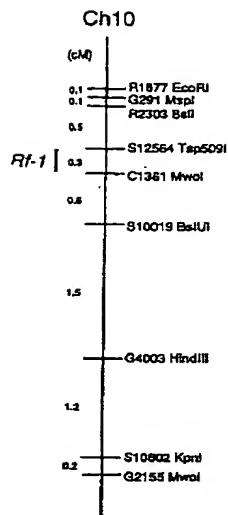


図1. Rf-1座の推定座乗位置

地図距離は1042F1個体の分離データから算出した。

フロントページの続き

(72)発明者 山本 敏央
静岡県磐田郡豊田町東原700番地 株式会
社オリノバ内

(72)発明者 新田 直人
静岡県磐田郡豊田町東原700番地 株式会
社オリノバ内

(72)発明者 竹森 尚樹
静岡県磐田郡豊田町東原700番地 株式会
社オリノバ内

Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 CA05 CA07
4B024 AA07 AA11 CA01 CA03 CA09
DA01 FA10 HA08 HA14 HA19
4B063 QA01 QA08 QA12 QA18 QQ04
QQ42 QR08 QR14 QR55 QR59
QR62 QS12 QS25 QS34